

。 技术与方法。

微波对核仁组成区银染色的促进作用

杨善民¹ 陈 平²

关键词 核仁组成区; 银染色; 微波; 超微结构

核仁组成区(NORs)是细胞某些染色体上携带着可转录核糖体的DNA(rDNA) 1975年 Goodpasture和 Bloom首次应用银染色显示哺乳动物染色体上的NORs^[1]。1980年 Howell和 Black^[2]应用明胶、蚁酸配制的硝酸银染色—显影液使核仁组成区银染色(AgNORs)与显影一步成功。Ploton已用于超微结构研究^[3]。微波是一种高频电磁波,已用于促进免疫组织化学染色。微波对NORs银染色作用国内外尚未见报告。本文采用不同浓度的硝酸银染色液,改变微波处理时间和样品承载方式,研究人肝细胞癌裸鼠移植瘤细胞(HHC₄)的AgNORs的染色性,取得较好的结果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 人肝细胞癌裸鼠移植瘤株(HHC₄)由本研究室建立^[4]。取裸鼠体内水平传代同一个瘤组织用于本实验。

1.1.2 试剂 蚁酸、硝酸银、亚铁氰化钾[K₃Fe(CN)₆]和柠檬酸铅均为分析纯。钨酸(OsO₄)为英国Johnson Matthey化学公司产品。明胶为医用产品。

1.1.3 仪器 微波炉(R5888,输出功率600W)为日本Sharp公司产品。透射电子显微镜(JEM100CX II)为日本电子公司制造。

1.2 方法

1.2.1 分组 NORs染色时将样品分为9组:第1组Howell和Black AgNORs染色法,第2~9组采用微波炉处理,输出功率调至最低档(10%,约60W),染色时间、硝酸银浓度和微波作用时样品承载方式方式见附表。另设一组为常规双固定电镜制样和染色组。

1.2.2 Howell和Black AgNORs染色法 取瘤组织(0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm)用0.1 mol/L磷酸缓

冲液(PBS)配制的2.5%戊二醛固定10 min,0.1 mol/L PBS洗涤后用Carnoy's固定液固定30 min,重新水化。1体积2%明胶和1%蚁酸溶液与2体积的50%硝酸银溶液混合,70℃染色10 min,染色液用无离子水配制。

1.2.3 AgNORs染色微波处理法 样品经上述戊二醛、Carnoy's溶液固定和水化后,将不同硝酸银浓度染色液与样品置于一小烧杯内,直接或置于冰水中进行不同时间微波处理,冰水容积约50 ml。硝酸银染色后的样品经无离子水洗涤3次,1%OsO₄和1%K₃Fe(CN)₆混合固定液固定2 h,常规Epon 618包埋,超薄切片不染色或经柠檬酸铅染色3 min后于透射电子显微镜下观察。

2 结 果

2.1 电镜下,常规双固定的HHC₄肝癌细胞在电镜下显示典型的肝癌细胞特征:癌细胞间有一毛细胆管形成。癌细胞核仁大,丝状核仁为主,核仁丝中见染色密度较低、细纤维状的核仁原纤维中心(图1),它是间期细胞核仁组成区的场所。

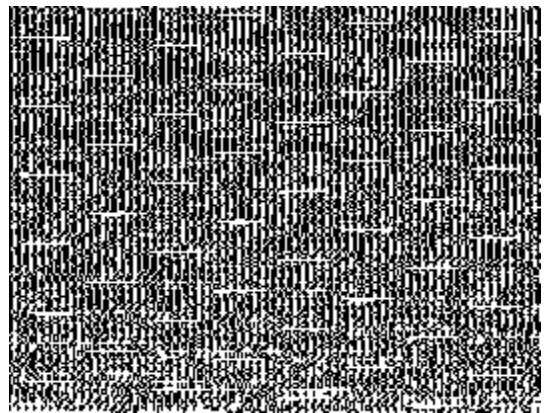


图1 肝癌细胞常规电镜制样所显示的毛细胆管(*),左上图示核仁原纤维中心(↑)。×9000

2.2 经 Howell和 Black AgNORs 染色^[2]后的癌细胞在电镜下显示硝酸银颗粒(15 nm)沉着,主要见于核仁内,略成圆环或球状;切片经柠檬酸铅染色后,银颗粒主要沉着在核仁原纤维中心周围,形状为圆环或球状,少见於核仁丝,核质内常有不少非特异性银颗粒沉着。在微波作用下(2~6组),低硝酸银浓度和短的染色时间都能使核仁组成区有银颗粒沉着,但银颗粒沉着较少且核质内非特异性银染色颗粒增多;第7~9组通过改变染色样品承载方式,核质内非特异染色明显减少,以微波处理180 s,采用10% AgNO₃染色液加冰水浴的银染色效果最好(图2)。本方法的银染色颗粒明显集中于原纤维中心周的核仁丝上,用微波促进核仁组成区银染色结果与Ploton^[3]染色结果相同(附表)。

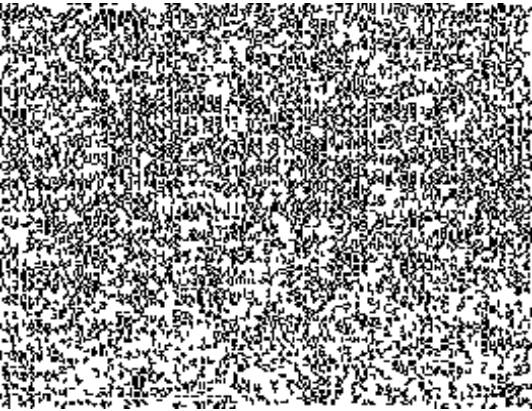


图2 在微波和冰水浴作用下,10% AgNO₃染色180 s, NORs银染色颗粒明显,特异性增强。×12700

附表 核仁组成区银染色试验条件与结果的比较				
分组	AgNO ₃ 浓度(%)	微波处理(s)	样品承载方式	结果
1	50(Howell法)	0	无	△◇
2	50	3	无	△
3	10	15	无	△◇
4	10	25	无	△◇
5	10	45	无	△◇
6	10	55	无	△◇
7	5	120	冰水浴	△
8	5	180	冰水浴	△
9	10	180	冰水浴	□

□: NORs银颗粒多,核质非特异性银颗粒少;△: NORs银颗粒少;◇: 核质非特异性银颗粒多。

3 讨论

间期细胞核仁组成区有其特殊的超微结构特点,已证明核仁内细纤维状的核仁原纤维中心为解链的核糖体DNA^[5],转录活性见于原纤维中心周围的致密纤维成分^[6], AgNORs染色物质为分子量100 kd的蛋白质^[5]。Howell和Black AgNORs染色产生的银颗粒在超薄切片不染色或经柠檬酸铅染色大多沉着在原纤维中心周围的核仁纤维丝上,提示本染色有一定的特异性,本染色过程因需要较高浓度的硝酸银和较高的温度(70℃)及较长时间(10 min)的温育^[3], NORs银染色颗粒沉着不多且核内常有非特异性银染色颗粒出现。

从本文结果来看, AgNORs染色过程中使用低能量微波能使染色所需的硝酸银浓度降低和染色时间缩短, NORs银染色颗粒能相对特异性沉着在原纤维中心周围的核仁丝上。由于微波处理过程中染色液和样品温度升得过高,易造成核内有非特异性银染色颗粒出现。本文设计了冰水浴,在合理使用承载方式下,使银染色颗粒明显集中于原纤维中心周的核仁丝上,形成圆环或球状,核质内非特异染色明显减少。推测微波作用下的染色液及样品发热能通过冰水浴迅速吸收,阻止了样品升温过高,使银染色效果明显增强,特异性好。AgNORs染色后所形成的特异银颗粒沉着有助于研究核仁蛋白在细胞不同周期时的核内的定位表达和变化过程。

微波处理后的组织增进了免疫组织化学反应^[7],其原理尚未明了。微波处理能使常规AgNORs染色时间缩短1/3强,硝酸银浓度降低80%。由微波炉磁控管在金属炉壁内产生微波能量场,并高速地不断变换正负极向,推测微波促使硝酸银染色液中银离子作高速运动,从而促进银离子与核仁蛋白的快速结合。有关微波促进AgNORs染色的机制有待进一步研究。

参考文献

1 Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar silver staining. *Chromosoma*, 1975; 53: 37
2 Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer a 1-step method *Experimentia*, 1980; 36: 1014
3 Ploton D, Bobichon H, Adnet JJ. Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one-step Ag-NOR staining method. *Biol Cell*,

- 1982; 43: 229
- 4 杨善民, 赵玉华, 陈 福, 等. 双标记人肝癌裸鼠实验研究. 北京实验动物科学, 1992; 19: 24
- 5 Jordan G. At the heart of the nucleolus. *Nature*, 1988; 329: 489
- 6 Fakan S, Hernandez-Verdun D. The nucleolus and the

nucleolar organizer region. *Biol Cell*, 1986; 56: 189

- 7 Resnick JM, Cherwitz D, Knapp D, et al. A microwave method that enhances detection of aberrant p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med*, 1995; 119: 360

(收稿: 1997-01-07 修回: 1997-04-27)

多聚乙烯亚胺——一种标记组织细胞中阴离子的探针

陈莲云 钟秀容 周琳瑛 梁 平

关键词 多聚乙烯亚胺; 阴离子; 细胞化学

细胞及组织中阴离子分布的变化在疾病发生发展中所起的作用已经受到重视, 现有研究表明细胞表面及基底膜中的阴离子是“电荷屏障”, 对带有不同电荷的物质有选择性通透作用, 在维持细胞的正常生理功能方面也有重要作用。本文介绍一种敏感性并能较精确定位细胞及组织中阴离子的标记物——多聚乙烯亚胺 (PEI) 及其在胃粘膜中的应用。

1 材料和方法

胃粘膜活检标本 10份, 迅速放入装有生理盐水 (0°C) 的青霉素小瓶中, 并剪成约 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$, 漂洗后, 根据文献报道的方法^[1], 浸入双蒸水配制的 0.5%~1% PEI (分子量 5000, Sigma 公司) 中 (0°C), 30 min 后用 0.1 mol 二甲胂酸钠缓冲液 (CBS), pH 7.4, 4°C 漂洗 3 次, 置 0.1% 戊二醛-2% 磷钨酸中 (pH 7.4, 4°C) 1 h, CBS 漂洗 3 次后, 再次浸入 0.5%~1% PEI 中 (4°C) 30 min, CBS 充分漂洗后, 1% OsO_4 后固定 1 h (4°C), 逐级乙醇-丙酮脱水, 环氧树脂 618 浸透, 包埋, 超薄切片经枸橼酸铅和醋酸铀各染 1 min, 使背景的电子密度有所增高, Hu-12A 透射电镜观察。

2 结 果

胃粘膜活检组织中绝大多数粘液细胞及固有层间质纤维细胞、浸润的炎症细胞和血管内皮细胞等

的超微结构均保存良好。阳性的 PEI 标记物电子密度明显高于背景。

多数粘液细胞表面质膜 PEI 标记阳性, 标记物为细小的颗粒状, 紧密排列, 间距极小甚至难以区分, 表现为连续的线性分布 (图 1)。大部分粘液细胞胞浆内细胞器未见 PEI 标记。粘液细胞及血管内皮细胞基底膜中 PEI 标记物为直径 15~25 nm 的小颗粒, 沿基底膜有序排列, 颗粒间距为 35~80 nm。PEI 亦可规律地标记于间质胶原原纤维上, 其大小及间距与基底膜中 PEI 标记物相似。

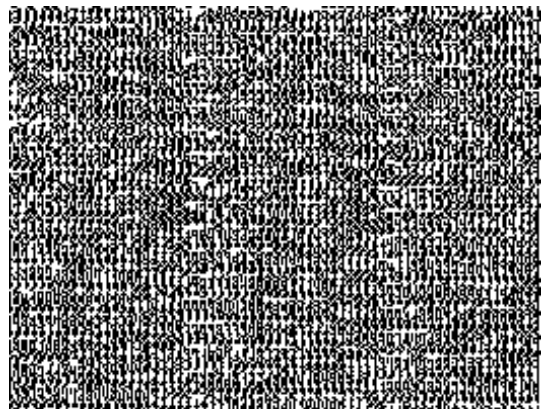


图 1 粘液细胞表面质膜 PEI 标记物呈紧密而连续的线性分布。

当组织、细胞在某些致病因素作用后, 阴离子分布发生改变时, PEI 标记亦表现为异常, 如在胃幽门螺杆菌感染较密集的区域可见粘液细胞游离面质膜